

## BDPAP2 REGULARÍA EL TIEMPO DE FLORACIÓN EN BRACHYPODIUM DISTACHYON

Gonzalo Lucía<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Evolutiva y Molecular de Plantas - Departamento de Biología Vegetal - Facultad de Ciencias Agrarias - UNL

Director/a: Uberti Manassero Nora  
Codirector/a: Muchut Sebastián Elías

Área: Ciencias Biológicas

### INTRODUCCIÓN

Aumentar el rendimiento de la producción de cultivos agrícolas es de suma importancia para lograr abastecer la creciente población mundial. *Brachypodium distachyon* es una gramínea que ha sido establecida recientemente como planta modelo de cultivos templados, por lo que conocer las vías que regulan la floración y la producción de granos en esta especie es importante para el desarrollo de nuevas estrategias de mejoramiento y cultivo.

Diversos estudios sobre la evolución molecular, en conjunto con estudios funcionales y de expresión en diferentes especies de gramíneas, sugieren que los genes MADS han jugado un rol central en la evolución y diversificación de las diferentes formas de inflorescencias de gramíneas. En particular, los genes *SEPALLATA* han sufrido repetidas duplicaciones luego del origen de las gramíneas dando lugar a cinco linajes. Entre ellos los subclados PAP2 (también llamado OsMADS34), OsMADS5 y OsMADS1, pertenecientes al clado LOFSEP, no tienen homólogos directos con otras angiospermas y son exclusivos de gramíneas (Malcomber y Kellogg, 2005).

Recientemente se ha reportado una vía de regulación conservada entre *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* (arroz), que determina la arquitectura de la inflorescencia en ambas plantas. En *A. thaliana* SOC1, SVP, AGL24 y SEP4, todas proteínas MADS-box, presentan funciones redundantes y regulan negativamente a *TFL1* en el meristema de inflorescencia (MI), a través de la formación de dímeros con AP1. Lo mismo ocurre con sus ortólogos en arroz, los cuales determinan la arquitectura de la inflorescencia a través de la regulación de *RCN4*, homólogo de *TFL1* (Liu y col., 2013).

En el presente trabajo realizamos estudios funcionales de BdPAP2, homólogo a PAP2 (OsMADS34) de arroz, en un organismo heterólogo como *A. thaliana*, con el fin de comprobar si la vía de regulación común entre arroz y *A. thaliana* se encuentra también conservada en *B. distachyon*.

Título del proyecto: Estudios funcionales de BdPAP2 y su rol en la arquitectura de la inflorescencia de *Brachypodium distachyon*

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2015

Organismo financiador: ANPCyT

Director/a: Uberti Manassero Nora



## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de investigación es determinar la función de BdPAP2 en la regulación de los meristemas de *B. distachyon*. En particular, se pretenden determinar las vías de regulación génica en las que participa BdPAP2, así como el grado de conservación funcional que presenta con sus homólogos en angiospermas en la determinación de la arquitectura de las inflorescencias.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estudios en *Arabidopsis thaliana*

Se transformaron plantas de *A. thaliana* Col-0 utilizando el método de inmersión floral (*Floral dip*). Estas plantas se denominaron 35S::BdPAP2, en tanto que como plantas control se utilizaron líneas estables transformadas con el vector binario pBI121.

Se realizó el análisis fenotípico haciendo énfasis en el tiempo de floración. Se realizaron extracciones de ADN genómico de las plantas seleccionadas y se detectó la presencia del transgén *BdPAP2* por PCR con oligonucleótidos específicos. Los productos de amplificación se corroboran utilizando la técnica de separación electroforética en gel de agarosa.

A los 22 días de edad de plantas control y 35S::BdPAP2 que aún no habían sufrido la transición de meristema vegetativo (MV) a MI, se realizó una extracción de ARN total, utilizando reactivo TransZol Up (Genbiotech), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La integridad del ARN obtenido se corroboró por separación electroforética en gel de agarosa. Posteriormente se realizaron reacciones de retro-transcripción siguiendo las especificaciones del fabricante de la transcriptasa reversa ImProm-II (Promega).

Los niveles de transcritos se cuantificaron por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Oligonucleótidos para *ACTINAS* fueron utilizados para referenciar la concentración de ADN copia (ADNc) en cada una de las muestras. Por su parte, se utilizaron oligonucleótidos para los integradores florales *SOC1* y *FT*, así como para *TFL1* y *BdPAP2*.

### Estudios en *Brachypodium distachyon*

En *B. distachyon* se trabajó con semillas de plantas control, denominadas 21.3, y de líneas mutantes insercionales, denominadas mutBdPAP2. Estas últimas poseen en el gen *BdPAP2* una inserción; en la inserción se incorpora un gen que brinda resistencia a higromicina, y cuatro secuencias repetidas del enhancer del promotor 35SCaMV. Se realizó el análisis fenotípico de las plantas de *B. distachyon*, centrándonos en el momento de floración de las mismas.

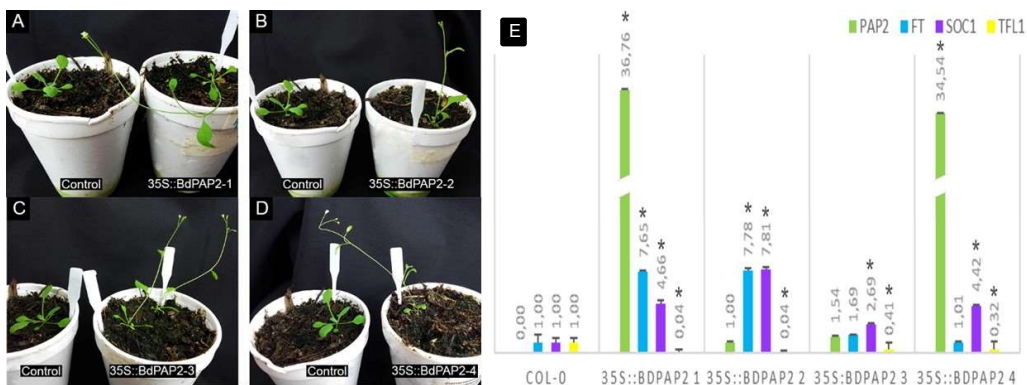
## RESULTADOS/CONCLUSIONES

Se estudiaron cuatro líneas independientes de *A. thaliana* 35S::BdPAP2. Se observó que todas las líneas transgénicas florecen entre 8 y 15 días antes que las plantas control (Figura I A-D). Coherentemente, estas plantas desarrollan menos hojas de roseta al momento de floración

respecto a las plantas control (Tabla 1).

Para corroborar la inserción del gen de interés, se realizó una amplificación por PCR sobre ADN genómico y separó por electroforesis en gel de agarosa. Se observó la presencia de una banda de aproximadamente 700 pb, la cual corresponde al tamaño de la región codificante de *BdPAP2*.

Posteriormente, se realizaron extracciones de ARN total, cuya integridad se corroboró por electroforesis, a fin de estudiar los niveles de expresión de diversos genes de interés. Para estimar los niveles de expresión de *BdPAP2* en las plantas transgénicas, se utilizó como referencia la línea 35S::*BdPAP2* 2, ya que fue la que presentó los menores niveles de amplificación del gen blanco. Para comparar los niveles de expresión de los demás genes analizados, se determinaron arbitrariamente como 1 los niveles de expresión obtenidos en las plantas control. Todas las líneas 35S::*BdPAP2* muestran elevados niveles de expresión de *BdPAP2* (Figura I E). Así mismo, las líneas transgénicas muestran mayores niveles de expresión de los integradores florales *SOC1* y *FT*, respecto a las plantas control. Este resultado es coherente con el fenotipo observado de floración acelerada. Sumado a esto, se puede observar que los niveles de expresión de *TFL1* en las plantas 35S::*BdPAP2* están significativamente disminuidos respecto a las plantas control. *TFL1* es el responsable de mantener las células indiferenciadas en el meristema reproductivo. Es posible que *BdPAP2* sea capaz de regular negativamente la expresión de *TFL1*, de manera similar a lo que se ha reportado para *SEP4*, homólogo de *BdPAP2* en *A. thaliana* (Liu y col., 2013). Dado que en el proceso de regulación génica la relación de concentraciones de las diferentes proteínas juega un rol importante en la transición y determinación de los meristemas, es probable que la combinación de bajos niveles de expresión de *TFL1* y los altos niveles de *SOC1* y *FT* sean motivo suficiente para promover que las plantas 35S::*BdPAP2* sufran la transición de MV a MI de manera anticipada.

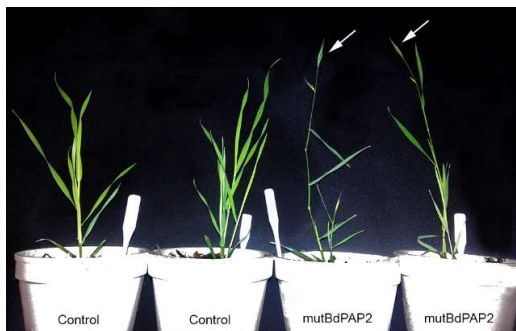


**Figura I. (A-D)** *A. thaliana* 35S::*BdPAP2* que poseen adelantado el tiempo de floración **(E)** Resultados de qPCR. Las barras con (\*) poseen diferencia significativa respecto al control.

Línea	Edad al momento de floración	Número de hojas de roseta al momento de floración
Col-0	31 ± 2,17	11 ± 1,64
35S:: <i>BdPAP2</i> 1	16 ± 2,60	5 ± 0,53
35S:: <i>BdPAP2</i> 2	23 ± 2,22	5 ± 0,53
35S:: <i>BdPAP2</i> 3	22 ± 2,43	6 ± 0,83
35S:: <i>BdPAP2</i> 4	21 ± 2,96	5 ± 0,74

**Tabla 1.** Datos del fenotipado de plantas Col-0 y 35S::*BdPAP2* de *A. thaliana*.

Para corroborar los resultados obtenidos en *A. thaliana*, estudiamos la función de BdPAP2 en plantas mutantes insercionales de *B. distachyon*. La inserción en el gen *BdPAP2* podría estar aumentando la expresión del mismo, ya que presenta 4 copias en tándem de la secuencia enhancer del promotor 35SCaMV. Resultados del fenotipado muestran que las plantas mutBdPAP2 adelantan el momento de floración respecto a las plantas control alrededor de 12 días (Figura II). La edad de las plantas mutBdPAP2 y control, así como el número de hojas que poseen al momento de floración, se puede observar en la tabla 2. Estos resultados son coincidentes con los observados en *A. thaliana*, lo cual nos permitiría inferir cierto grado de conservación funcional entre ambas especies, al menos relacionado con el control de los tiempos de floración.



Línea	Edad al momento de floración	Número de hojas al momento de floración
Control 21.3	41 ± 2,36	19 ± 3,65
mutBdPAP2	29 ± 1,31	9 ± 2,15

**Tabla 2.** Datos del fenotipado de plantas Control y mutBdPAP2 de *B. distachyon*.

**Figura II.** *B. distachyon* mutBdPAP2 poseen adelantado el tiempo de floración respecto a las Control. Las flechas blancas señalan las flores de dichas plantas.

Según el estudio de Li y col., (2016), en *A. thaliana*, dímeros de SOC1/AP1, SVP/AP1, AGL24/AP1 y SEP4/AP1 se unen a la secuencia CCAAAAATGGAAA presente en la región reguladora 3' del gen *TFL1*, bloqueando la generación de un loop que une la región aguas debajo del codón de terminación de este gen con la región reguladora 5' del mismo, resultando en la disminución de la expresión de *TFL1*. PAP2 de arroz, homólogo a SEP4, interaccionaría con homólogos de AP1, logrando una regulación similar sobre los tres homólogos de *TFL1* en arroz, *RCN 1/2/4*, especialmente sobre *RCN4*. En *B. distachyon* existen 3 homólogos de *TFL1* denominados *BdRCN1*, *BdRCN2* y *BdRCN4*. Análisis bioinformáticos preliminares de las secuencias reguladoras de dichos genes, muestran que *BdRCN4* posee la secuencia CCAAAAATGGAAA conservada en su región reguladora 3'. Esta información permitiría inferir que la regulación de *TFL1* mediada por el dímero SEP4/AP1 que ocurre en *A. thaliana* y arroz podría encontrarse también conservada en *B. distachyon*

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Li, Q., Wang, Y., Wang, F., Guo, Y., Duan, X., Sun, J. y An H. (2016). Functional conservation and diversification of *APETALA1/FRUITFULL* genes in *Brachypodium distachyon*. *Physiologia Plantarum* 157: 507–518.
- Liu, C., Teo, Z. W., Bi, Y., Song, S. Xi, W., Yang, X., Yin, Z. y Yu, H. (2013) A conserved genetic pathway determines inflorescence architecture in *Arabidopsis* and rice. *Developmental Cell*, 24, 612-622.
- Malcomber, S.T., y Kellogg, E.A. (2005). *SEPALLATA* gene diversification: brave new whorls. *Trends in plant science*, 10 (9), 427-435.